

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-000264

(43)Date of publication of application : 09.01.1996

(51)Int.Cl.

C12N 9/16

(21)Application number : 06-294548

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 29.11.1994

(72)Inventor : MIWA TETSUYA
KAWAI MISAKO
ASANO MINAO
SUZUKI SHUNICHI
SHIBAI HIROSHIRO

(30)Priority

Priority number : 06 83138 Priority date : 21.04.1994 Priority country : JP

(54) NEW THIOL PROTEASE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new enzyme originated from the cotyledon of a germinated soybean, having characteristic properties, capable of efficiently decomposing proteins stored in the seed of soybean into amino acids or low mol.wt. peptides, and giving the decomposition products for food raw materials, natural seasonings, feeds, etc.

CONSTITUTION: A new thiolprotease is originated from the cotyledon of a germinated soybean, has an action to decompose proteins stored in the seed of soybean into amino acids or low mol.wt. peptides, has the optimal pH of approximately 3-7, has the optimal temperature of approximately 30-50° C, has a mol.wt. (SDS-PAGE) of approximately 26-30KD, uses soybean 7S globulin, soybean 11S globulin or bovine serum albumin as a substrate, is inhibited with 2-trans- epoxysuccinyl-L-leucylamide (4-guanidino)-butane, and is activated with 2-mercaptoethanol, cysteine or reduction glutathione, and is useful for food raw materials, natural seasonings, feeds, etc. The enzyme can be obtained by homogenizing the cotyledon of the soybean in a phosphoric acid buffer solution cooled with ice, centrifuging the homogenized solution, and subsequently separating from the supernatant.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 28.05.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3503220

[Date of registration] 19.12.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-264

(43)公開日 平成8年(1996)1月9日

(51)Int.Cl.⁶
C 1 2 N 9/16

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全9頁)

(21)出願番号 特願平6-294548

(22)出願日 平成6年(1994)11月29日

(31)優先権主張番号 特願平6-83138

(32)優先日 平6(1994)4月21日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72)発明者 三輪 哲也

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の

素株式会社中央研究所内

(72)発明者 河合 美佐子

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の

素株式会社中央研究所内

(72)発明者 浅野 皆夫

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の

素株式会社中央研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規チオールプロテアーゼ

(57)【要約】

【構成】 本発明は発芽ダイズ子葉に由来し、ダイズ種子貯蔵タンパク質を分解する新規チオールプロテアーゼ及び当該新規チオールプロテアーゼを用いるダイズタンパク質の新規分解方法に関する。

【効果】 本発明の新規チオールプロテアーゼはダイズタンパク質を著しく加水分解し、その分解産物はアミノ酸あるいはアミノ酸数残基程度の小ペプチドにまで至る。従って、該チオールプロテアーゼを用いればダイズタンパク質を効率よく分解することができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 発芽ダイズ子葉に由来し、ダイズ種子貯蔵タンパク質をアミノ酸又は低分子ペプチドまで分解し得る下記の性質を有するチオールプロテアーゼ。

- 1) 至適pH: 約3~7
- 2) 至適温度: 約30~50°C
- 3) 分子量 (SDS-PAGE): 約26~30KD
- 4) 基質: ダイズ7Sグロブリン、ダイズ11Sグロブリン、牛血清アルブミンを基質とする。
- 5) 阻害剤: トランス-エボキシサクシニル-L-ロイシルアミド (4-グアニジノ)-ブタンで阻害される
- 6) 活性化剤: 2-メルカブトエタノール、システイン、還元型グルタチオンで活性化される。

【請求項2】 請求項1記載のチオールプロテアーゼをダイズタンパク質に接触、反応させることを特徴とするダイズタンパク質の分解方法。

【請求項3】 請求項1記載のチオールプロテアーゼを含む発芽ダイズ子葉を破碎して得られる細胞抽出液をダイズタンパク質に接触、反応させることを特徴とするダイズタンパク質の分解方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、従来のプロテアーゼでは分解の難しいダイズ種子貯蔵タンパク質を容易に分解する、発芽ダイズ中に見いだされた新規チオールプロテアーゼ、及び該チオールプロテアーゼ若しくは該チオールプロテアーゼを含む細胞抽出液を用いるダイズタンパク質の加水分解方法に関する。ダイズタンパク質分解産物は、現在、食品原料、天然調味料、飼料など様々な分野で利用されている。

【0002】

【従来の技術】 ダイズタンパク質のアミノ酸への分解は、塩酸や硫酸による酸分解や、あるいは麹菌などの微生物酵素をはじめとする既存のプロテアーゼによる分解(特開昭51-70852号、特公昭55-32344、特公平03-60480、特開昭62-239966、特開平02-2392、特開平03-112461)などにより行われている。

【0003】 さて、酸による加水分解を行った場合、天然調味料になり得るようなダイズタンパク質加水分解産物を得ようとすると、反応条件は100°C、1~2日間かかり、高温、長時間の反応はエネルギー消費量が大きい。さらに、酸によるタンパク質の加水分解法は簡便である一方、アミノ酸の過剰(破壊)分解、中和のために高塩分となることなどの欠点がある。

【0004】 これを解決するための、既存プロテアーゼによる穏和な条件下での分解が考えられた。しかしながら、一般にマメ科植物の貯蔵タンパク質は、未変性の状態では既存のプロテアーゼに対してかなりの耐性を有することが知られている(S.S.Nielsen et al., J. Agric. Food Chem. 36, 896 (1988))。即ち、未変性ダイズ

2

タンパク質の難分解性ゆえ、酵素的に完全分解に至らしめるためには予め変性処理を必要とする。このためには大規模な装置が必要であり、又効率よく反応を進行させるためには、厳密な変性状態の設定が必要である。そのうえ、反応には長い時間を要する。更に、脱脂大豆などの原料は完全な滅菌が困難なため、反応中の雑菌の混入という問題点がある。この問題の克服のため、非常に高濃度の塩や酢酸等の添加が必要になるという問題がある。

【0005】 従って、ダイズタンパク質を変性処理の有無に関わらず短時間で容易に分解し、また、雑菌の混入しにくい酸性やアルカリ性領域でも反応し得るような酵素の発見、又、当該酵素を用いたダイズタンパク質の完全分解法の開発が待ち望まれている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは上記のダイズタンパク質の酵素分解に使用する酵素をダイズそのものの中に求めることを考えた。これは、ダイズの発芽に伴い、種子中の貯蔵タンパク質が非常に短時間にアミノ酸にまで完全に分解されてしまうからである。すなわち、発芽ダイズ中には貯蔵タンパク質を容易に、しかも高度に低分子に分解するプロテアーゼ、あるいはプロテアーゼ群が存在することが予想された為である。

【0007】 さて、発芽ダイズ中に見いだされるタンパク質加水分解酵素としては、7Sグロブリン分解酵素(K.A. Wilson et al., Plant Physiol. 82, 71 (1986)、X. Qi et al., Plant Physiol. 99, 725 (1992))、11Sグロブリン分解酵素(K.A. Wilson et al., Plant Physiol. 82, 71 (1986)、K.A. Wilson et al., Plant Physiol. 88, 355 (1988))、ポーマン-バーグ型トリプシンインヒビター分解酵素(M.A. Madden et al., Phytochemistry 24, 2811 (1985))、クーニッジ型トリプシンインヒビター分解酵素(P.M. Hartl et al., Phytochemistry 25, 23 (1986)、K.A. Wilson et al., Plant Physiol. 88, 355 (1988))、カルボキシペプチダーゼ(久保田幸穂、薬学雑誌 96(5), 639 (1976))、セリンプロテアーゼ(M. Akhtaruzzaman et al., Biosci. Biotech. Biochem. 56(6), 878 (1992))などが知られている。

【0008】 しかしながら、これらの酵素は合成基質やカゼインなどの非特異的なタンパク質を基質として探索が行われたため、発見されたプロテアーゼが必ずしもダイズ貯蔵タンパク質を分解するとは限らなかった。また、分解する場合でも限定的な分解産物を生じさせるに留まった。一方、7Sグロブリンや11Sグロブリンといった実際のダイズ貯蔵タンパク質を基質とした探索から発見された酵素でも、発芽初期の貯蔵タンパク質の形態に見られるような限定的な分解産物を生じさせることしかできず、アミノ酸又はアミノ酸2~3残基の小さなペプチドにまで分解を至らしめるような酵素は未だ発見

50

されていない。

【0009】更に、これらの酵素は活性だけを確認し、酵素の同定が行われていないのがほとんどである。従って、本発明の目的は発芽ダイズ中に存在するダイズタンパク質をアミノ酸又はアミノ酸2～3残基の低分子ペプチドにまで分解を至らしめるような酵素、及び該酵素を利用したダイズタンパク質の完全分解方法の提供である。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究を行い、ダイズタンパク質の新たな分解法に使用し得る酵素を、発芽ダイズ子葉抽出液より見いだし、本発明を完成するに至らしめた。即ち、本発明は、7Sグロブリン、11Sグロブリンをはじめとするダイズタンパク質を、容易に分解する活性を有する発芽ダイズ子葉中プロテアーゼに関するものである。具体的には、発芽ダイズ子葉に由来し、ダイズ種子貯蔵タンパク質をアミノ酸又は低分子ペプチドまで分解しえる下記の性質を有する新規チオールプロテアーゼである。

性質：

- 1) 至適pH：約3～7
- 2) 至適温度：約30～50°C
- 3) 分子量（SDS-PAGE）：約26～30KD
- 4) 基質：ダイズ7Sグロブリン、ダイズ11Sグロブリン、牛血清アルブミンを基質とする。
- 5) 阻害剤：トランス-エボキシサクシニル-L-ロイシルアミド（4-グアニジノ）-ブタン（E-64）で阻害される
- 6) 活性化剤：2-メルカブトエタノール、システイン、還元型グルタチオンで活性化される。

【0011】さらに本発明は、発芽ダイズ子葉を破碎して得られる細胞抽出液、又は該細胞抽出液より精製されて得られる新規チオールプロテアーゼそのものをダイズタンパク質に接触、反応させることを特徴とするダイズタンパク質の分解方法に関するものである。以下に本発明を詳細に説明する。

【0012】なお、本発明に於て新規チオールプロテアーゼは後述の実施例においてプロテアーゼD3と呼ばれる。また、本発明の新規チオールプロテアーゼは2種類のアイソザイムが存在するが、いずれも至適pH、至適温度、分子量、阻害剤の種類、活性化剤の種類、ダイズ種子貯蔵タンパク質をアミノ酸又は低分子ペプチドまで分解するという作用のいずれの点に於いても著しい一致を見る。従って、本発明に於いてはいずれのアイソザイムも本発明でいう新規チオールプロテアーゼに含むものとする。従って、本発明に於いては新規チオールプロテアーゼというば両方のアイソザイムの総称を意味する。

【0013】尚、両アイソザイムを区別する為に、便宜上一方をD3- α 、他の方をD3- β と称する。D3- α のN末端付近のアミノ酸配列を配列表の配列番号1

に、D3- β のN末端付近のアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。

【0014】本発明の新規チオールプロテアーゼを得るための材料として用いられる発芽ダイズは、そのダイズの種類を問わない。すなわち市販されているダイズ、搾油原料として用いられているダイズ等、その栽培産地、品種を限定しない。また、発芽の方法、栽培条件、発芽の有無、発芽後の期間を問わないが、好ましくはダイズ種子を吸水させ、10日間生長させた発芽ダイズを材料として用いるのがよい。

【0015】本発明の新規チオールプロテアーゼの調製は、上述のダイズを酵素源として用いる。ダイズから好ましくは子葉のみを収穫し、酵素の抽出源とする。尚、当該新規チオールプロテアーゼを工業的に利用する場合、ダイズタンパク質の分解反応はこのダイズ抽出液によって行うか、あるいはこの粗精製品を用いてもよい。もちろん、精製した酵素を用いてもよい。

【0016】本発明の新規チオールプロテアーゼの精製法は後述の実施例に詳しく記す。また、発芽ダイズ子葉を破碎して得られる細胞抽出液の調製方法も実施例に詳しく記す。

【0017】本発明の新規チオールプロテアーゼの作用は、通常のタンパク質、例えば、カゼインや牛血清アルブミン、ヘモグロビンなどのタンパク質のみならず、通常のプロテアーゼでは分解が困難な未変性状態の11Sグロブリン、あるいは7Sグロブリン、あるいはダイズ発芽時にダイズ子葉中に見いだされる7Sグロブリンの分解中間体（かかる分解中間体は以降ではc30と呼ぶ）などのダイズタンパク質を上記の通常のタンパク質と同様にオリゴペプチド、あるいはアミノ酸のレベルにまで高度に分解することが特徴である。詳細は実施例5を参照のこと。

【0018】本発明の新規チオールプロテアーゼの活性化剤について検討を行った所、還元剤を添加すると著しく活性が向上することが分かった。例えば、2-メルカブトエタノール、システイン、還元型グルタチオン、ジチオスレイトールなどの還元剤の添加により、本酵素による分解反応は著しく促進される。

【0019】本発明の新規チオールプロテアーゼの至適pHは約3～7、厳密にはpH約3.5～5.5、より厳密にはpH約3.5～5.0の範囲である（図1参考）。この範囲で反応を行えばよい。また、当該新規チオールプロテアーゼの至適温度は約30～50、厳密には約35～45°Cの範囲である（図2参考）。従って、この範囲で反応を行えばよい。

【0020】本発明の新規チオールプロテアーゼに対する阻害剤の影響を調べた。その結果、E-64（トランス-エボキシサクシニル-L-ロイシルアミド（4-グアニジノ）-ブタン）により強く阻害され、PMSF（フェニルメタンスルホニルフルオリド）、3、4-D

C I (3, 4-ジクロロイソクマリン)などにより弱く阻害される(表3参照)。のことより、本発明の新規チオールプロテアーゼが活性の発現にシステイン残基が関与するチオールプロテアーゼであることがわかる。

【0021】上述したように、本発明の新規チオールプロテアーゼは2種類のアイソザイムとして存在するが、これらの分子量は同一で、SDS-PAGE上で分子量約26~30KD、厳密には約27~29.5KDと測定される(図3参照)。

【0022】ダイズタンパク質を分解する場合、本発明の新規チオールプロテアーゼをそのまま用いても良いが、発芽ダイズ子葉を破碎して得られる細胞抽出液を用いることもできる。反応条件として例えば、発芽ダイズ抽出液とダイズタンパク質原料とを混合し、50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)、0.2M NaCl、2mM アジ化ナトリウム、10mM 2-メルカブトエタノール存在下、30°Cで分解反応を行うと、ダイズタンパク質の著しい分解が見られる。また、単に純水中で反応させても比較的効率よく分解する。

【0023】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づいて説明する。

【0024】<実施例1. c30の精製>ダイズ貯蔵タンパク質分解酵素の探索のため、7Sグロブリン限定分解産物c30を基質として用いることとした。精製源となるダイズは(株)サカタのタネから購入し、人工気象室(日本医化社製)において明12時間、暗12時間、温度25°Cで栽培した。c30の精製源としては、上記の明暗培養を1日単位として発芽後7日目のダイズ子葉を用いることとした。

【0025】ダイズ子葉からのc30を含む粗タンパク質の抽出は、子葉重量1に対して氷冷した5倍量の緩衝液1(50mMリン酸カリウム緩衝液、1M NaCl、2mM アジ化ナトリウム、pH 7.0)を加え、ジューサーミキサーで10分間ホモジナイズすることにより行った。この抽出液から以下の手順でc30を精製した。

【0026】抽出液をガーゼで濾過したのち、4°Cで20000g×30分間遠心し、その上清を濾紙(アドバンテック東洋社製、No.2)で濾過した。濾液のpHを、塩酸で4.8に調製し、4°Cで2時間静置した。その後、4°Cで20000g×30分間遠心し、その上清を再び濾紙(同上)で濾過した。濾液を膜濃縮した後、緩衝液1を用いて透析を行い、溶媒置換した。

【0027】次に、調製した粗タンパク質溶液を、緩衝液1により平衡化したレクチンリガンドアフィニティー担体Con A Sepharose(ファルマシア社製)に供し、カラムクロマトグラフィーを行った。この操作によりc30は担体に吸着した。カラムに緩衝液1を通して非吸着タンパク質を充分に洗い出した後、50mM α-メチル-D-マンノシドを含んだ緩衝液1をカラムに供することにより、c30を溶出させた。

【0028】この画分中のc30の純度をSDS-PAGEによって観察したところ、ごくわずかにダイズレクチンと思われるバンドを含むものの、その大部分がc30であった。この画分を膜濃縮した後、緩衝液2(35mM リン酸カリウム緩衝液、0.4M NaCl、2mM アジ化ナトリウム、pH 7.6)に対して透析し、最後に20000g×10分間遠心して、上清をc30の精製標品とした。

【0029】<実施例2. c30分解酵素の探索>上記精製c30を基質として、分解活性を発芽ダイズ子葉抽出液から探索した。まずははじめに、発芽後10日目の子葉抽出液中のc30分解活性を測定した。発芽後10日目のダイズ子葉重量1に対して氷冷した5倍量の緩衝液3(10mM リン酸ナトリウム緩衝液、140mM NaCl、2mM アジ化ナトリウム、pH 4.0)を加えホモジナイズしたタンパク質溶液を、c30を精製したときと同様に、ガーゼ濾過、遠心、濾紙による濾過により精製し、粗精製酵素溶液1を調製した。Lowry法によるタンパク質濃度定量を行って、最終濃度で0.5mg/m1と成るよう調製したこの粗精製酵素溶液と、同じく最終濃度0.5mg/m1と成るように調製したc30とを混合し、50mM 酢酸ナトリウム(pH4.0)、0.2M NaCl、2mM アジ化ナトリウム存在下で30°C、18時間反応させ、反応の前後の様子をSDS-PAGEによって観察した。その結果、c30の分解にともなうバンドの消失が観察され、ゲル上で新たな限定分解産物を確認することはできなかった。したがって、この分解は新たな限定分解ではなく、その産物がアミノ酸などの低分子である可能性が示された。また、この反応時に還元剤である10mMの2-メルカブトエタノールを添加すると、c30分解反応の著しい促進が認められた。

【0030】<実施例3. c30分解酵素の精製>発芽後10日目の子葉の抽出液中にc30分解活性が認められたため、その反応を担う酵素をD3と呼び、酵素D3の精製を、以下の手順にしたがって行った。酵素溶液の分解活性は、上述の反応条件下でc30分解反応を行い、SDS-PAGEによってc30のバンドの減少を観察し、さらに反応物をイメージアナライザー(ファルマシア社製イメージマスター)に供して、その分解の程度を定量した。尚、活性の単位として、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)、0.2M NaCl、2mM アジ化ナトリウム、10mM 2-メルカブトエタノール存在下、30°Cで、1分間に1μgのc30を分解する酵素量を1U(ユニット)と定義した。

【0031】1. 濃縮：上述のように調製された粗精製酵素溶液1を、水酸化ナトリウムによってpH6.5に調製し、4°Cで一晩静置した後、濾紙(アドバンテック東洋社製、No.514A)で濾過し、濾液を膜濃縮装置(ミリボア社製、ミニタン)によって濃縮した。

【0032】2. 穀水性クロマトグラフィー：濃縮した溶液に20%飽和となるよう硫酸アンモニウムを加え、20%飽和硫安を含む緩衝液4(50 mM リン酸カリウム緩衝液、2 mM アジ化ナトリウム、pH 6.2)に対して透析した。透析後得られた溶液を2000 g × 30分間遠心し、その上清を得た。ここで得られた上清を、20%飽和硫安を含む緩衝液4で平衡化した穀水性クロマトグラフィーカラムPhenyl Sepharose HP(ファルマシア社製)に付した。この操作によりc30分解酵素は担体に吸着した。次に、20%飽和硫安を含む緩衝液4により非吸着タンパク質を洗い流した後、飽和硫安を含む緩衝液4を溶出液として用いて吸着されたタンパク質の溶出を行った。このとき緩衝液4中の飽和硫安濃度を直線的に20%から0%へ変化させることにより、吸着されたタンパク質を溶出させた。得られた各溶出画分についてc30分解活性を測定したところ、分解活性を有する2つの画分が認められた。これらを溶出順に酵素D3-α画分、酵素D3-β画分とした。それぞれの溶出時の硫安濃度は、D3-α画分がおよそ2%飽和、D3-β画分は0%飽和であった。また、D3-α画分に存在すると思われるc30分解酵素をD3-αとし、D3-β画分に存在すると思われるc30分解酵素をD3-βとした。

【0033】3. 陰イオン交換クロマトグラフィー：得られた2つの酵素画分をそれぞれ膜濃縮し、100 mM NaClを含む緩衝液4(これを緩衝液5とする)に対して透析した。透析後に得られる各溶液をそれぞれ2000 g × 10分間遠心し、それぞれの上清を得た。ここで得られた上清を、緩衝液5で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムMono Q(ファルマシア社製)に付した。この操作により、D3-α画分に含まれるc30分解酵素も、D3-β画分に含まれるc30分解酵素も担体に吸着した。次に、緩衝液5により、非吸着タンパク質を洗い流した後、NaClを含む緩衝液4を溶出液として用いて吸着されたタンパク質の溶出をおこなった。このとき、緩衝液中のNaCl濃度を直線的に100 mMから400 mMへ変化させることにより、吸着されたタンパク質を溶出させた。溶出画分のc30分解活性を測定したところ、分解活性を有するのは、D3-α画分に由来する上清、D3-β画分に由来する上清のどちらを付した場合でもそれぞれ1画分であった。また、D3-αを含む画分およびD3-βを含む画分の両者の陰イオン交換クロマトグラフィーからの溶出位置を比較すると、D3-αの方がD3-βに比べ高濃度のNaClによって溶出された。すなわち、D3-αはおよそ200 mMのNaClで、D3-βはおよそ130 mMのNaClでそれぞれ溶出した。

【0034】4. ゲル通過：D3-αを含む画分、D3-βを含む画分をそれぞれ膜濃縮し、緩衝液5に対して透析した。透析後の溶液を2000 g × 10分間遠心

し、その上清を得た。ここで得られた上清を、緩衝液5で平衡化したゲル通過カラムSe-phacryl S 200HR(ファルマシア社製)に付した。各流出画分のc30分解活性を測定したところ、D3-α、D3-βはともに、分子量およそ2万8千-3万2千程度と見積もられる位置に溶出した。活性画分を非還元状態下でSDS-PAGEに付し、クマジーブリリアントブルー染色したところ、D3-αおよびD3-βはともに、ほぼ1本のバンドになるまでに精製されていることが確認され、それぞれの分子量は約26～30 KD、厳密には約27～29.5 KDと見積もられた(図3参照)。

【0035】この精製による比活性の上昇を測定した。前出粗精製酵素溶液1のc30分解の非活性はおよそ0.2 U/mgであったのに対し、精製されたD3-α、D3-βはともに、非活性およそ100 U/mgであった。この結果から、上述の精製フローにより、プロテアーゼD3は比活性でおよそ500倍に精製されたことがわかった。

【0036】<実施例4. プロテアーゼD3のN末端付近のアミノ酸配列の決定>上記のように精製された2つのプロテアーゼD3のN末端付近の配列を以下のように決定した。精製プロテアーゼ画分のうち、タンパク質量約2 μg分を SDS存在下ポリアクリラミドゲル電気泳動した後、ゲル中のプロテアーゼD3を膜フィルターに転写し、プロテインシーケンサーによってアミノ酸配列をN末端から解析した。即ち、ミリボア社ミリプロットを用い、セミドライ方式(タンパク質構造解析、平野久著、東京化学同人)によって電気泳動後のゲルからポリビニリデンフルオリド(PVDF)膜に目的酵素を転写した。続いて、PVDF膜上の目的酵素をプロテインシーケンサー(A BI社製、モデル476A)に付し、N末端アミノ酸配列解析を行った。

【0037】N末端からそれぞれ、D3-αは30残基、D3-βは23残基のアミノ酸配列が決定した。D3-αのN末端付近のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に、D3-βのN末端アミノ酸配列を配列番号2に示した。

【0038】<実施例5. プロテアーゼD3と麹菌酵素とのダイズタンパク質分解活性の比較>プロテアーゼD3と麹菌由来プロテアーゼ(プロテアーゼM、天野製薬(株)製)の、ダイズタンパク質分解活性を以下のように比較した。

【0039】プロテアーゼD3は以下のように調製した。前述の粗精製酵素溶液1を、水酸化ナトリウムによりpH 7.0に調製した後、硫安分画を行った。活性の認められた40%～80%飽和硫安画分を緩衝液5に対して透析を行った後、2000 g × 10分間遠心しその上清を得た。この上清を、緩衝液5によって平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムQ-Sepharose FFF(ファルマシア社製)に付した。この操作

によりプロテアーゼD3は担体に吸着した。非吸着タンパク質を緩衝液5により洗い流した後、NaClを含む緩衝液5を用いて溶出を行った。このとき溶出液中のNaCl濃度を直線的に400mMまで変化させることにより、本発明のプロテアーゼD3を溶出させた。これにより粗精製酵素溶液2を得た。このクロマトグラフィー操作において、活性画分の2成分への分離は見られなかつたため、得られた酵素溶液はD3- α 及び β が混在していると考えられた。

【0040】麹菌酵素プロテアーゼMは、50mMリン酸緩衝溶液(pH 7.0)に溶解することにより調製した。

【0041】分解基質としては、脱脂大豆より常法により調製した7Sグロブリン(β-コングリシン)、11Sグロブリン(グリシン)、上述の精製法により調製したc30、シグマ社製のダイズクーニッツ型トリプシンインヒビター、および牛血清アルブミン(ASA)を用いることとした。ダイズタンパク質は未変性のまま反応に供した。

【0042】反応は50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)、200mM NaCl、2mMアジ化水【表1】
プロテアーゼD3とプロテアーゼMとのタンパク質分解活性の比較1

(SDS-PAGEでの比較)

基質	プロテアーゼD3	プロテアーゼM
BSA	+++	+++
7Sグロブリン	+++	+
c30	+++	++
11Sグロブリン	+++	+
ダイズクーニッツ型 トリプシンインヒビター	-	-

-: 分解が認められない

+: 限定分解のみ

++: ゲル上から若干のバンドの消失

+++: ゲル上からの著しいバンドの消失

【0046】両酵素の各タンパク質基質分解活性を、NBD-F法による遊離アミノ基定量で測定した結果を表2に示した。両酵素は互いにその精製度が異なるため、単純な比活性の比較ができない。そこで、ダイズタンパク質の酵素分解により生じる遊離アミノ基の量を、ASAの分解によって生じる遊離アミノ基の量に

*ナトリウム、10mM 2-メルカプトエタノール存在下で30°C、18時間行った。基質タンパク質濃度は全て0.5mg/mlとし、添加する酵素濃度はプロテアーゼMは5μg/ml、粗精製酵素溶液2は10μg/mlとした。タンパク質濃度はLowry法により定量した。

【0043】分解の程度の見積りは、SDS-PAGEおよび、NBD-F(4-Fluoro-4-Nitrobenzofurazan、和光純薬(株)製)を用いた遊離アミノ基の定量(K. Imai, Y. Watanabe, Anal. Chim. Acta. 130, 377 (1981))により行った。

【0044】両酵素の各タンパク質基質分解活性を、SDS-PAGEで観察した結果を表1に示した。この結果より、本発明のプロテアーゼD3によるダイズタンパク質の分解は、単なる限定分解ではなく、より低分子に至るような分解であることが示された。またその活性をASAの分解を基準に比較すると、麹菌酵素に比べ本発明のプロテアーゼD3(チオールプロテアーゼ)の方が勝っていることが示された。

20 【0045】

【表1】

よって規格化することとした。この値を、ASA分解に対する各基質の分解指数と定義した。これにより、酵素の各基質に対する分解しやすさを、ASAを分解する場合を基準に数値化することができた。表2の結果より、プロテアーゼMによる分解では、ダイズタンパク質はASAに比べ2~8倍分解されにくことがわかった。一方、プロテアーゼD3による分解では、ダイズタンパク質はASAと変わらず分解されていることがわかった。また、両酵素の各基質に対する分解指数を比較すると、プロテアーゼD3の方が3~9倍それぞれの基質をよく分解

していることがわかり、プロテアーゼD3のダイズタンパク質分解における有用性が示された。

* [表2]

プロテアーゼD3とプロテアーゼMとのタンパク質分解活性の比較2

(NBD-F法での比較)

基質	対BSA分解指数		分解指数比 ($\text{プロテアーゼD3}/\text{プロテアーゼM}$)
	プロテアーゼD3	プロテアーゼM	
1Sケーロフリン	1.24	0.26	4.77
c30	1.68	0.54	3.11
11Sケーロフリン	1.03	0.12	8.58
ダイズタニッケ型	0.27	0.00	-
トウモロコシインヒビタ			

[0048] <実施例6. プロテアーゼD3の至適pHと至適温度の決定>反応温度による酵素活性の変化(至適温度)の測定は、以下のように行った。

[0049] c30(反応時0.5mg/ml)を含む50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)、10mM2-メルカブトエタノール、200mM塩化ナトリウム、2mMナトリウムアジド、80μlを5分間各温度(30°C-70°C)の温浴中でプレインキュベートした。続いて、20μl(60mU)のD3-α、またはβを添加し、攪拌、引き続き6時間インキュベートした。

[0050] 酵素添加直後(反応0時間)と反応6時間の反応溶液を用いて、酵素活性を測定した。測定結果は図2に示した。図2から分かるように、本発明の新規プロテアーゼD3-α及びD3-βはいずれも、その至適温度を約30~50、より厳密には約35~45°Cの範囲にもつ(図2参考)。

[0051] 反応pHによる酵素活性の変化(至適pH)は以下方法で測定した。

[0052] 酵素反応緩衝液には辛酸ナトリウム(pH2.0、3.0、3.5,)、酢酸ナトリウム(4.0、4.5、5.0、5.5)、Tris-HCl(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)、炭酸ナトリウム(9.0、9.5、10.5)緩衝液を用いた。

[0053] c30(反応時0.5mg/ml)を含む50mM各pH緩衝液、10mM2-メルカブトエタノール、200mM塩化ナトリウム、2mMナトリウムアジド90μlに10μl(5mU)のD3-α、又はβを添加し反応試料液とした。これを攪拌後1時間インキュベートした。

[0054] 酵素添加直後(反応0時間)と反応18時間の反応溶液を用いて、酵素活性を測定した。測定結果は図1に示した。図1から分かるように、本発明のプロテアーゼD3(D3-α及びD3-βのいずれも)の至適pHは約3~7、厳密にはpH約3.5~5.5の範囲、より厳密にはpH約3.5~5.0の範囲であることが分かった。

30 [0055] <実施例7. プロテアーゼD3に対する各種プロテアーゼインヒビターの効果>プロテアーゼD3に対する各種プロテアーゼインヒビターの効果を調べた。使用したインヒビターは、トランス-エボキシサクシニル-L-ロイシルアミド(4-グアニジノ)-ブタン(E-64)、3,4-ジクロロイソクマリン(3,4-DCI)、フェニルメタンスルホニルフルオリド(PMS F)、EDTA、ペプスタチンAで、全てシグマ社より購入した。酵素源は上述の実施例2と同じく、粗精製酵素溶液1を濃度0.5mg/mlで用い、基質はc30とし、濃度0.5mg/mlで用いた。タンパク質濃度はLowry法により定量した。

40 [0056] 活性測定は以下のように行った。酵素源は、各インヒビターと混合した後、氷上で1時間静置した。その後基質を加え、50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)、200mMNaCl、2mMアジ化ナトリウム、10mM2-メルカブトエタノール存在下で30°C、18時間反応を行った。活性測定は、SDS-PAGEによるc30バンドの減少を観察し、イメージアナライザーを用いて定量した。

50 [0057] 各インヒビターを加えた場合の活性測定の

13

結果を表3に示した。この結果よりプロテアーゼD3がチオールプロテアーゼであることが示された。繰り返し述べるが、本発明の新規チオールプロテアーゼはプロテアーゼD3と同一のものである。

【0058】

【表3】

プロテアーゼD3に対する各種プロテアーゼインヒビターの効果

14

イントリーカー	濃度	残存活性 (相対値)
-	-	100
B-64	20 μM	5
S.4-DCI	500 μM	71
PMSF	5 mM	61
EDTA	10 mM	100
ペーパースキン	50 μM	100

【0059】

【発明の効果】本発明の新規チオールプロテアーゼはダイズタンパク質を含む原料から、変性処理の有無に関わらず、アミノ酸含量が高い、分解の進んだ加水分解物を生産する際に、極めて有効な酵素と考えられる。

【0060】また、本発明の新規チオールプロテアーゼは、その分解活性の強さによる反応時間の短縮、又好ましい反応条件が約pH3.5~5.5の範囲の酸性領域下ということから、既存プロテアーゼによる分解では問題になる、ダイズタンパク質分解反応中の雑菌の混入という問題を、低塩濃度下でも克服することが期待される。

【0061】本発明の新規チオールプロテアーゼ単独での分解でも、高アミノ酸含量のダイズタンパク質加水分解物を得ること、若しくは場合によりタンパク質原料のアミノ酸への完全分解を也可能にすることが期待できる。また、従来知られているダイズタンパク質の分解法と組み合わせて使用することにより、即ち、従来法で分解するタンパク質原料の前処理としての利用、あるいは、従来法では分解出来ずに残った基質の分解をするための利用などにより、タンパク質原料のアミノ酸への完全分解ができると期待される。

【0062】また、本発明の新規チオールプロテアーゼ※

配列

Asp	Lys	Leu	Pro	Glu	Ser	Val	Asp	Trp	Arg	Lys	Glu	Gly	Ala	Val
1						5				10				15
Pro	Pro	Val	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Xaa	Gly	Ser	Xaa	Trp	Ala	Phe

※の活性がダイズ子葉中に出現する時期と、上記の発芽時のダイズタンパク質の分解中間体(c30)が、さらに分解される時期はほぼ一致するため、当該新規チオールプロテアーゼがダイズ細胞内でもc30の分解を担っている可能性が高いと推定される。また、従来の研究では、7Sグロブリンの発芽初期における限定分解を担うと思われる酵素に関しての報告(X. Qi et al., Plant Physiol. 99, 725 (1992))が知られている。しかし、本発明の新規チオールプロテアーゼのように、その分解産物がSDS-PAGE観察できなくなるほどの低分子にまで分解されるような酵素の報告はないため、生物学的観点からも本発明の新規チオールプロテアーゼは注目されるべきものであることも最後に記載する。

【0063】

【配列表】

配列番号：1

40 配列の長さ：30

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

フラグメント型：N末端フラグメント

起源：

生物名：Glycine max

15

25

30

(ただし、Xaaは未同定のアミノ酸を表わす)

【0064】配列番号：2

配列の長さ：23

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列

Asp	Lys	Leu	Pro	Asp	Ser	Val	Asp	Trp	Arg	Lys	Glu	Gly	Ala	Val
1				5						10			15	
Pro	Pro	Val	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly							
20		23												

【図面の簡単な説明】

【図1】 プロテアーゼD3- α 及びD3- β の活性のpHプロファイルを示した図である。【図2】 プロテアーゼD3- α 及びD3- β の活性の※

* 配列の種類：タンパク質

フラグメント型：N末端フラグメント

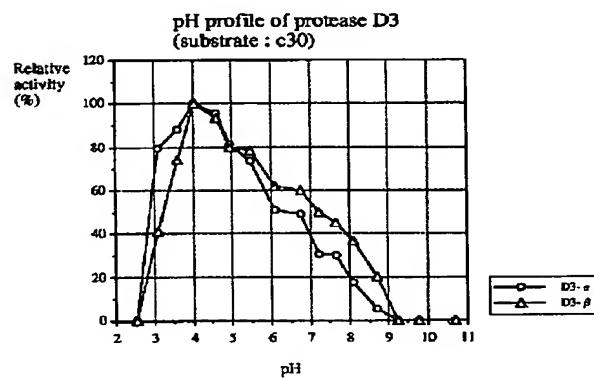
起源：

* 生物名：Glycine max

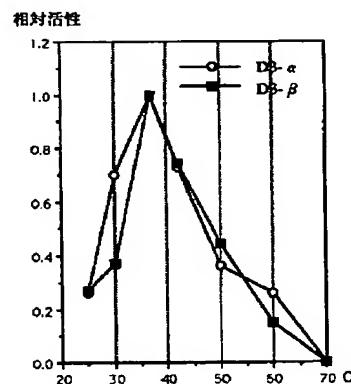
※温度プロファイルを示した図である。

【図3】 精製したプロテアーゼD3- α 及びD3- β を SDS-PAGEの後、クマジー染色した電気泳動像を示した図である。

【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 鈴木 俊一

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

(72)発明者 柴井 博四郎

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成13年12月11日(2001.12.11)

【公開番号】特開平8-264

【公開日】平成8年1月9日(1996.1.9)

【年通号数】公開特許公報8-3

【出願番号】特願平6-294548

【国際特許分類第7版】

C12N 9/16

【F I】

C12N 9/16

【手続補正書】

【提出日】平成13年5月28日(2001.5.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 発芽ダイズ子葉に由来し、ダイズ種子貯蔵タンパク質をアミノ酸又は低分子ペプチドまで分解し得る下記の性質を有するチオールプロテアーゼ。

1) 至適pH: 約3~7

2) 至適温度: 約30~50°C

3) 分子量(SDS-PAGE): 約26~30KD

4) 基質: ダイズ7Sグロブリン、ダイズ11Sグロブリン、牛血清アルブミンを基質とする。

5) 阻害剤: トランス-エポキシサクシニル-L-ロイシルアミド(4-グアニジノ)-ブタンで阻害される

6) 活性化剤: 2-メルカブトエタノール、システィン、還元型グルタチオンで活性化される。

【請求項2】 請求項1記載のチオールプロテアーゼをタンパク質に接触、反応させることを特徴とするタンパク質の分解方法。

【請求項3】 請求項1記載のチオールプロテアーゼを含む発芽ダイズ子葉を破碎して得られる細胞抽出液をタンパク質に接触、反応させることを特徴とするタンパク質の分解方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正内容】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、従来のプロテアーゼでは分解の難しいダイズ種子貯蔵タンパク質を容易に分解する、発芽ダイズ中に見いだされた新規チオールプロテ

アーゼ、及び該チオールプロテアーゼ若しくは該チオールプロテアーゼを含む細胞抽出液を用いるダイズタンパク質の加水分解方法に関する。タンパク質分解産物は、現在、食品原料、天然調味料、飼料など様々な分野で利用されている。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】さらに本発明は、発芽ダイズ子葉を破碎して得られる細胞抽出液、又は該細胞抽出液より精製されて得られる新規チオールプロテアーゼそのものをダイズタンパク質に接触、反応させることを特徴とするタンパク質の分解方法に関するものもある。以下に本発明を詳細に説明する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】なお、本発明に於て新規チオールプロテアーゼは後述の実施例においてプロテアーゼD3と呼ばれる。また、本発明の新規チオールプロテアーゼは2種類のアイソザイムが存在するが、いずれも至適pH、至適温度、分子量、阻害剤の種類、活性化剤の種類、ダイズ種子貯蔵タンパク質をアミノ酸又は低分子ペプチドまで分解するという作用のいずれの点に於いても著しい一致を見る。従って、本発明に於いてはいずれのアイソザイムも本発明でいう新規チオールプロテアーゼに含むものとする。従って、本発明に於いては新規チオールプロテアーゼとは両方のアイソザイムの総称を意味する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正内容】

【0026】抽出液をガーゼで濾過したのち、4°Cで20000g×30分間遠心し、その上清を濾紙（アドバンティック東洋社製、No.2）で濾過した。濾液のpHを、塩酸で4.8に調整し、4°Cで2時間静置した。その後、4°Cで20000g×30分間遠心し、その上清を再び濾紙（同上）で濾過した。濾液を膜濃縮した後、緩衝液1を用いて透析を行い、溶媒置換した。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正内容】

【0032】2. 疎水性クロマトグラフィー：濃縮した溶液に20%飽和となるよう硫酸アンモニウムを加え、20%飽和硫安を含む緩衝液4（50mM リン酸カリウム緩衝液、2mM アジ化ナトリウム、pH 6.2）に対して透析した。透析後得られた溶液を20000g×30分間遠心し、その上清を得た。ここで得られた上清を、20%飽和硫安を含む緩衝液4で平衡化した疎水性クロマトグラムPhenyl Sepharose HP（ファルマシア社製）に付した。この操作によりc30分解酵素は担体に吸着した。次に、20%飽和硫安を含む緩衝液4により非吸着タンパク質を洗い流した後、飽和硫安を含む緩衝液4を溶出液として用いて吸着されたタンパク質の溶出を行った。このとき緩衝液4中の飽和硫安濃度を直線的に20%から0%へ変化させることにより、吸着されたタンパク質を溶出させた。得られた各溶出画分についてc30分解活性を測定したところ、分解活性を有する2つの画分が認められた。これらを溶出順に酵素D3- α 画分、酵素D3- β 画分とした。それぞれの溶出時の硫安濃度は、D3- α 画分がおよそ2%飽和、D3- β 画分は0%飽和であった。また、D3- α 画分に存在すると思われるc30分解酵素をD3- α とし、D3- β 画分に存在すると思われるc30分解酵素をD3- β とした。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正内容】

【0034】4. ゲル濾過：D3- α を含む画分、D3- β を含む画分をそれぞれ膜濃縮し、緩衝液5に対して透析した。透析後の溶液を20000g×10分間遠心し、その上清を得た。ここで得られた上清を、緩衝液5で平衡化したゲル濾過カラムSephacryl S200HR（ファルマシア社製）に付した。各流出画分のc30分解活性を測定したところ、D3- α 、D3- β とともに、分子量およそ2万8千~3万2千程度と見積もられる位置に溶出した。活性画分を非還元状態下でSDS-PAGEに付し、クマジーブリリアントブルー染色したところ、D3- α およびD3- β はともに、ほぼ1本のバンドになるまでに精製されていることが確認され、それぞれの分子量は約26~30KD、厳密には約27~29.5KDと見積もられた（図3参照）。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正内容】

【0039】プロテアーゼD3は以下のように調製した。前述の粗精製酵素溶液1を、水酸化ナトリウムによりpH7.0に調整した後、硫安分画を行った。活性の認められた40%~80%飽和硫安画分を緩衝液5に対して透析を行った後、20000g×10分間遠心しその上清を得た。この上清を、緩衝液5によって平衡化した陰イオン交換クロマトグラムQ-Sepharose FF（ファルマシア社製）に付した。この操作によりプロテアーゼD3は担体に吸着した。非吸着タンパク質を緩衝液5により洗い流した後、NaClを含む緩衝液5を用いて溶出を行った。このとき溶出液中のNaCl濃度を直線的に400mMまで変化させることにより、本発明のプロテアーゼD3を溶出させた。これにより粗精製酵素溶液2を得た。このクロマトグラフィー操作において、活性画分の2成分への分離は見られなかっただため、得られた酵素溶液はD3- α 及び β が混在していると考えられた。